

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-060608

(43)Date of publication of application : 02.03.1999

---

(51)Int.Cl.

C08B 37/08

---

(21)Application number : 09-237659

(71)Applicant : CHISSO CORP

(22)Date of filing : 19.08.1997

(72)Inventor : SATO IKUO  
NISHIKAWA MASAHICO  
MIENO KAZUNORI

---

(54) PREPARATION OF HIGH PURITY HYALURONIC ACID OR SALT THEREOF

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a process for preparing hyaluronic acid (salt) by cultivation capable of obtaining high purity hyaluronic acid (salt) by a simple purification method.

SOLUTION: In a culture medium, microorganisms capable of producing hyaluronic acid are cultured to accumulate hyaluronic acid or the salt and a quaternary ammonium salt is added to the culture solution to specifically precipitate hyaluronic acid or a salt thereof and the microorganismic bodies. The precipitate is washed with pure water, dissolved in an aqueous salt solution having a salt concentration of not lower than 0.3 mole/l, then cooled to 0°C-5°C to separate and remove the resulting crystals of a quaternary ammonium salt together with the microorganismic bodies, and the solution thus obtained is subjected to crystallization with an organic solvent to obtain high purity hyaluronic acid or a salt thereof.

---

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

11.06.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-60608

(43) 公開日 平成11年(1999) 3月2日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

C 0 8 B 37/08

C 0 8 B 37/08

Z

審査請求 未請求 請求項の数4 F D (全 3 頁)

(21) 出願番号 特願平9-237659  
(22) 出願日 平成9年(1997) 8月19日

(71) 出願人 000002071  
チッソ株式会社  
大阪府大阪市北区中之島3丁目6番32号  
(72) 発明者 佐藤 郁夫  
熊本県水俣市築地4番118号  
(72) 発明者 西川 正彦  
熊本県水俣市陣内2-8-13  
(72) 発明者 三重野 和典  
鹿児島県出水市米ノ津町26番18号  
(74) 代理人 弁理士 野中 克彦

(54) 【発明の名称】 高純度ヒアルロン酸もしくはその塩の製造法

(57) 【要約】

【課題】簡単な精製方法で高純度のヒアルロン酸（塩）の得られる培養法によるヒアルロン酸（塩）の製造方法を提供する。

【解決手段】ヒアルロン酸産生能を有する微生物を培地に培養して、ヒアルロン酸もしくはその塩を、培養液中に蓄積させ、該培養液に4級アンモニウム塩を添加し、ヒアルロン酸もしくはその塩と菌体のみを特異的に沈殿させ、該沈殿を純水で洗浄後、0.3モル／リットル以上の塩濃度の塩水溶液に溶解せしめたのち、0℃～5℃に冷却し、生成した4級アンモニウム塩の結晶を菌体とともに分離、除去したのち、得られた溶液を有機溶剤にて晶析して高純度ヒアルロン酸もしくはその塩を得る。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】ヒアルロン酸産生能を有する微生物を培地に培養して、ヒアルロン酸もしくはその塩を培養液中に蓄積させ、該培養液に4級アンモニウム塩を添加し、ヒアルロン酸もしくはその塩と菌体のみを特異的に沈殿させ、該沈殿を純水で洗浄後、0.3モル/リットル以上の塩濃度の塩水溶液に溶解せしめたのち、0℃～5℃に冷却し、生成した4級アンモニウム塩の結晶を菌体とともに分離、除去し、その後溶液を有機溶剤にて晶析することを特徴とする高純度ヒアルロン酸もしくはその塩の製造法。

【請求項2】ヒアルロン酸産生能を有する微生物がストレプトコッカス・ピオゲネス(*Streptococcus pyogenes*)、ストレプトコッカス・エクイシミリリス(*Streptococcus equisimilis*)、ストレプトコッカス・エクイ (*Streptococcus equi*)、ストレプトコッカス・デイスガラクテイエ(*Streptococcus dysgalactiae*)、ストレプトコッカス・ゾーエビデミカス(*Streptococcus zooepidemicus*)のなかから選ばれた1種以上の微生物である請求項1記載の高純度ヒアルロン酸もしくはその塩の製造法。

【請求項3】0.3モル/リットル以上の塩濃度の塩水溶液が塩化ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウムおよび硫酸マグネシウムのなかから選ばれた1種以上の塩の水溶液である請求項1記載の高純度ヒアルロン酸もしくはその塩の製造法。

【請求項4】請求項1の純水での洗浄において、その洗浄で発生する上澄み液が電気伝導度で1.0mS/cm以下になるまで洗浄することを特徴とする請求項1記載の高純度ヒアルロン酸もしくはその塩の製造法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、培養法により、医薬、化粧品、食品等広範囲に利用されるヒアルロン酸もしくはその塩（以下、ヒアルロン酸（塩）という）を高純度で製造する方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】従来より、ヒアルロン酸（塩）の工業的製造法としては、主として、にわりのとさから該ヒアルロン酸（塩）を抽出する方法（抽出法）もしくはヒアルロン酸産生能を有する微生物を培地に培養して該培養液より採取する方法（発酵法）により行われている。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】従来の発酵法の技術では、ヒアルロン酸（塩）の精製段階で、まず遠心分離もしくはフィルタープレス等の方法により培養液と菌体とを分離し、その後、該菌体を除去した培養液を限外濾過、4級アンモニウム塩沈殿、活性炭等による不純物吸着、アルコールによる晶析等の精製工程を組み合わせ処理され、純度の高いヒアルロン酸（塩）が製造されている。これらの精製法は抽出法の精製工程に比べるとか

なり簡略になってはいるが、更なる工程の短縮が望まれているのが現状である。本発明者らは簡単な方法で高純度のヒアルロン酸（塩）を得る方法について鋭意研究した。その結果、ヒアルロン酸産生能を有する微生物を培養した培養液に、直接、4級アンモニウム塩を添加し、ヒアルロン酸（塩）と菌体のみを特異的に沈殿させ、ついで該沈殿を純水で洗浄したのち、0.3モル/リットル以上の塩濃度の塩水溶液に該沈殿を溶解せしめたのち、得られた溶液を0℃～5℃に冷却し、発生した4級アンモニウム塩の結晶を菌体とともに分離し、その後、純水で該結晶を洗浄したのち、0.3モル/リットル以上の塩濃度の塩水溶液に溶解せしめ、適当な有機溶剤にて晶析を行うことにより、高純度のヒアルロン酸（塩）が得られることを見出し、本発明を完成した。

## 【0004】

## 【課題を解決するための手段】

(1) ヒアルロン酸産生能を有する微生物を培地に培養して、ヒアルロン酸もしくはその塩を培養液中に蓄積させ、該培養液に4級アンモニウム塩を添加し、ヒアルロン酸もしくはその塩と菌体のみを特異的に沈殿させ、該沈殿を純水で洗浄後、0.3モル/リットル以上の塩濃度の塩水溶液に溶解せしめたのち、0℃～5℃に冷却し、生成した4級アンモニウム塩の結晶を菌体とともに分離、除去し、その後溶液を有機溶剤にて晶析することを特徴とする高純度ヒアルロン酸もしくはその塩の製造法。

(2) ヒアルロン酸産生能を有する微生物がストレプトコッカス・ピオゲネス(*Streptococcus pyogenes*)、ストレプトコッカス・エクイシミリリス(*Streptococcus equisimilis*)、ストレプトコッカス・エクイ (*Streptococcus equi*)、ストレプトコッカス・デイスガラクテイエ(*Streptococcus dysgalactiae*)、ストレプトコッカス・ゾーエビデミカス(*Streptococcus zooepidemicus*)のなかから選ばれた1種以上の微生物である前記第1項記載の高純度ヒアルロン酸もしくはその塩の製造法。

(3) 0.3モル/リットル以上の塩濃度の塩水溶液が塩化ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウムおよび硫酸マグネシウムのなかから選ばれた1種以上の塩の水溶液である前記第1項記載の高純度ヒアルロン酸もしくはその塩の製造法。

(4) 前記第1項の純水での洗浄において、その洗浄で発生する上澄み液が電気伝導度で1.0mS/cm以下になるまで洗浄することを特徴とする前記第1項記載の高純度ヒアルロン酸もしくはその塩の製造法。

## 【0005】

【発明の実施の形態】本発明で用いるヒアルロン酸産生能を有する微生物（以下、ヒアルロン酸生産菌という）としては、ストレプトコッカス属、例えばストレプトコッカス・ピオゲネス(*Streptococcus pyogenes*)、ストレプトコッカス・エクイシミリリス(*Streptococcus equi*)

milis)、ストレプトコッカス・エクイ(*Streptococcus equi*)、ストレプトコッカス・デイスガラクテイエ(*Streptococcus dysgalactiae*)およびストレプトコッカス・ズーエピデミカス(*Streptococcus zooepidemicus*)のなかから選ばれた1種以上の微生物を挙げることができる。

【0006】以下の説明で特に断らない限り、%は重量(g)/容量(d l)%を用いた。また、ここで言う純水とは電気伝導度0.15 mS/cm以下の水をいう。本発明に用いる培地は、ヒアルロン酸生産菌を培養するのに通常用いられる培地を用いればよく、例えば、グルコース3.0%、酵母エキス1.0%、リン酸1カリウム0.3%、リン酸2カリウム0.2%、チオ硫酸ナトリウム0.01%、硫酸マグネシウム7水塩0.01%、亜硫酸ナトリウム0.002%、塩化コバルト0.001%、塩化マンガン0.001%を含む成分でpH6.0~8.5に調整された培地を用いることができる。

【0007】本発明の培養にあつては、通気攪拌培養もしくは振とう培養のいずれを用いてもよく、培養温度は20℃~40℃、好ましくは30℃~38℃である。培養時間は20時間~70時間で、培養液の粘度上昇がみられなくなった時点で培養を停止する。

【0008】本発明の精製で用いる4級アンモニウム塩水溶液は0.01~50%、好ましくは5~20%の濃度の4級アンモニウム塩水溶液を、培養液もしくはその希釈水溶液に培養液もしくはその希釈水溶液の0.01~3.0倍容量、好ましくは0.15~1.0倍容量の割合で添加し、ヒアルロン酸(塩)と菌体のみを特異的に沈殿させる。培養液もしくはその希釈水溶液に添加する4級アンモニウム塩はヒアルロン酸(塩)と複合体を形成し沈殿するものであれば特に制限はないが、好ましくは塩化セチルピリジニウム、臭化セチルトリメチルアンモニウム、塩化セチルトリメチルアンモニウム等を挙げることができる。上澄み液を除去したのち、該沈殿を純水で洗浄し、洗浄液の電気伝導度が1.0mS/cm以下、好ましくは0.5mS/cm以下なるまで洗浄することが好ましい。洗浄後、沈殿を0.3モル/リットル以上、好ましくは0.3~1.5モル/リットルの塩化ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウムおよび硫酸マグネシウムのなかから選ばれた1種以上の塩の水溶液、好ましくは塩化ナトリウムもしくは酢酸ナトリウム水溶液に溶解せしめたのち、得られた溶液を0℃~5℃に冷却する。発生した4級アンモニウム

塩の結晶を菌体とともに分離、除去したのち、得られた溶液にその2倍容量以上の有機溶剤、好ましくはエタノール、イソプロピルアルコール、メタノールもしくはアセトンを添加することで晶析を行う。蓄積した沈殿を回収後、真空乾燥を行うことにより高純度のヒアルロン酸(塩)が得られる。この方法を用いると、従来法に比べ遥かに簡単な操作で高純度のヒアルロン酸(塩)を得ることができる。

【0009】

【実施例】以下にその実施例を示す。なお、ヒアルロン酸(塩)の純度の測定は化粧品種別配合規格(ヒアルロン酸ナトリウム(2))記載のグルクロン酸定量法によった。ここで、高純度とは上記のグルクロン酸定量法により測定したときの該グルクロン酸含有量が40.0~50.0重量%のものをいう。

【0010】実施例1

炭素源としてブドウ糖6.1%、窒素源として酵母エキス1.6%、リン酸1カリウム0.3%、リン酸2カリウム0.2%、チオ硫酸ナトリウム0.01%、硫酸マグネシウム7水塩0.01%、亜硫酸ナトリウム0.002%、塩化コバルト0.001%、塩化マンガン0.001%を含む培地1.7リットルに、予め37℃で10時間培養したストレプトコッカス・ズーエピデミカスFERMBP878(微工研条寄 第878号)100ミリリットルを接種し、37℃で、48時間培養する。培養終了後、得られた培養液1.8リットルに純水を2倍容量加えて希釈したのち、5%の塩化セチルピリジニウム水溶液を希釈培養液の0.15倍容量添加する。発生した沈殿を純水で洗浄し、洗浄液の電気伝導度が0.5 mS/cmになるまで洗浄する。該沈殿を培養液と同量の0.3モル/リットル濃度の塩化ナトリウム水溶液に溶解後、5℃に冷却する。発生した塩化セチルピリジニウムの結晶と菌体を遠心分離にて除去のち、得られた溶液の2倍容量のエタノールにて晶析し、沈殿物を乾燥して6.5gのヒアルロン酸ナトリウム塩を得た。得られた該ヒアルロン酸ナトリウム塩の純度を測定するとグルクロン酸含有量で45重量%以上の高純度ヒアルロン酸ナトリウム塩であった。

【0011】

【発明の効果】ヒアルロン酸培養液に4級アンモニウム塩の所定量を直接、添加して精製処理することにより、高純度のヒアルロン酸(塩)を容易に得ることができる。